

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26711013

研究課題名(和文)細胞ターンオーバーを介した組織の時間軸制御機構の解明

研究課題名(英文)Dissecting the mechanism of tissue growth to adjust time-dependent morphogenesis

研究代表者

大澤 志津江(Ohsawa, Shizue)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：80515065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の発生過程では、個体の成長速度に合わせて組織成長が進行するが、個体と組織の成長速度が調和して進行する分子機構は不明である。研究代表者らは、幼虫期の成長が遅延するショウジョウバエ変異体Minute(リボソームタンパク質をコードする遺伝子に機能欠損変異を持つ一連の変異体)に着目し、個体の成長遅延に応じて組織の成長速度を調整する仕組みを解析した。その結果、幼虫期の成長遅延は、翅原基(翅を形成する組織)でのモルフォゲンWinglessの発現上昇と協調して「細胞ターンオーバー」(細胞死と細胞増殖による細胞の入れ替え)を引き起こし、それにより正常な翅形成を実現されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Although tissue growth is coordinated along the developmental time scale in animals, the molecular basis remains elusive. We examined the mechanism by which tissue growth is coordinated in animals that causes developmental delay, by using a series of Drosophila mutant that have a mutation in gene encoding ribosomal protein, Minute. Minute show significant delay in the progression of their larval period, but importantly they develop to almost normal adult flies. We found that developmental delay cooperate with upregulation of Wingless expression in wing discs, which trigger “cell-turnover” and the following normal wing morphogenesis during development.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：組織成長 細胞ターンオーバー 成長遅延 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

時間情報は位置情報に加え、多細胞生物の発生を制御する重要なファクターである。すなわち、組織を構成する個々の細胞が発生に要する時間を適切に利用することで、正確な形・大きさの組織が形成され、個体が構築される。しかしながらこれまで、この発生時間軸の重要性はほとんど見過ごされてきており、①組織を構成する細胞集団が個体全体の時間をいかにして調節するのか、また、②発生過程において環境変化や外的刺激、あるいは突然変異などの「偶発的变化」が生じた際に、個々の細胞がどのように応答して組織の成長速度を調節し、個体発生を正常に進行させるのか（あるいは、そもそも細胞が時間軸の調整を介して組織の動的恒常性維持を行うシステムが存在するのか）は分かっていない。

研究代表者は、この問題に取り組むために、「Minute」と呼ばれるショウジョウバエ変異体に着目した。Minute 変異体は、リボソームタンパク質をコードする遺伝子群の一つに機能欠質変異を持つ一連の変異体の総称であり、その表現型としては「幼虫期における個体の成長速度の遅延」が知られている。重要なことに、Minute 変異体は幼虫期に個体の成長速度が顕著に低下するものの、最終的には正常な形・大きさ・機能をもった組織（個体）が形成される。すなわち Minute 変異体では、成長速度の低下という「個体の時間軸変化」に合わせて正常な組織形成を実現する動的恒常性維持機構が働いていると考えられた。そこで、この未知の恒常性維持機構を明らかにするために、Minute 変異体幼虫の発生過程を詳細に解析した。その結果、驚くべきことに Minute 変異体の翅原基のブレード領域（翅部分を形成する領域；pouch）では、個体成長の遅れに伴って細胞死と細胞増殖が相互依存的に著しく亢進していることを見いだした。さらに、この細胞死／細胞増殖による細胞の入れ替え（「細胞ターンオーバー」）が pouch で起こることが、正常な翅形成を行う上で必須であることを見いだした。これらの予備的知見は、個体の時間軸に変化が生じると細胞が集団としての振る舞い（細胞ターンオーバー）を変化させることで組織の成長速度を調節し、個体の成長速度に調和した組織成長を実現することを示唆している。興味深いことに、①ショウジョウバエの変態タイミングを制御する分泌性のインスリン様ペプチド *dilp8* の遺伝子量を減らすことで Minute 変異体の成長速度を人為的に早めると、pouch における細胞ターンオーバーが抑制されること、また、②野生型幼虫の複眼原基の一部に損傷を与えて人為的に個体成長を遅らせることによっても pouch における細胞ターンオーバーを誘導できることを見いだしており、これらの知見は「細胞集団の振る舞いが組織の時間軸を形成・調節する」という上記仮説を強く支持している。

2. 研究の目的

本研究では、成長遅延という個体の発生時間軸変化に呼応して引き起こされる細胞ターンオーバーの分子機構を解析することで、細胞間コミュニケーションを介した組織の時間軸形成・成長制御機構の理解を目指した。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ遺伝学的手法および免疫組織化学・ライブイメージング技術を用い、翅原基において細胞ターンオーバーが誘発される分子機構を解析した。

4. 研究成果

Minute 変異体の翅原基を構成する細胞集団が、時間軸変化に応答してその振る舞いを変化させる機構は何か。遺伝的背景の均一な Minute 翅原基には、細胞ターンオーバーを引き起こす何らかの化学場の変化が存在すると考えられた。研究代表者らは、翅原基で濃度勾配を形成するモルフォゲンに着目してその関与を検証した。Minute 翅原基で引き起こされる細胞死のパターンを詳細に観察すると、興味深いことに細胞死は、pouch の D/V 軸上に局所的に存在するモルフォゲン Wingless (Wg) (Wt ホモログ分子) 発現細胞に沿って、特定の距離を保った位置で引き起こされていることが分かった (図1)。

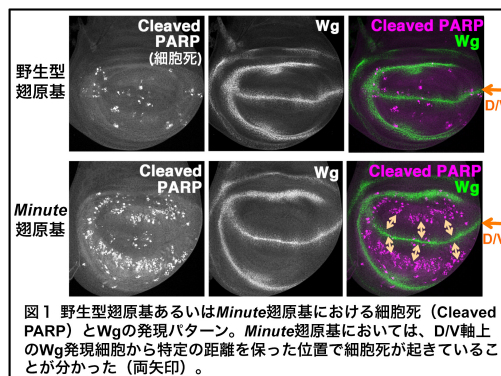
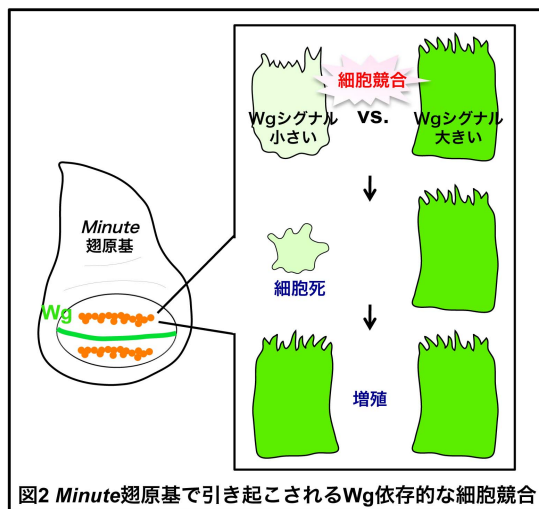


図1 野生型翅原基あるいはMinute翅原基における細胞死 (Cleaved PARP) とWgの発現パターン。Minute翅原基においては、D/V軸上のWg発現細胞から特定の距離を保った位置で細胞死が起きていることが分かった (両矢印)。

また Wg シグナルを活性化している細胞を観ると、Minute 翅原基では、野生型翅原基に比べて広い領域で Wg シグナルが活性化していること、および細胞死を起こしている細胞は、まさに Wg シグナルを活性化している細胞に隣接した、Wg シグナルを活性化していない（あるいは Wg シグナル活性が弱い）細胞であることが分かった。これらの観察結果は、Wg シグナル活性が相対的に低い細胞 (D/V 軸から遠い細胞) が細胞死を起こして組織から排除され、相対的に高い細胞 (D/V 軸に近い細胞) が余分に増殖する「Cell competition (細胞競合)」が Minute 翅原基で起こっていることを示唆するものである (※細胞競合とは、同種の細胞間で生体内環境 (組織) への適応度を競合する現象で、相対的に適応度の低い細胞 (loser) が細胞死を起

こして組織から排除され、適応度の高い細胞 (winner) が余分に増殖して空いたスペースを占有する「細胞の適者生存」競争である)。そこで、このような Wg シグナルに依存した細胞競合が Minute 翅原基で引き起こされているのかを調べるために、Minute 翅原基における Wg の濃度勾配を遺伝学的に緩和した。具体的には、D/V 軸境界上での Wg の発現を抑制する、あるいは pouch 領域全体で Wg の発現を高めることで pouch における Wg シグナル活性勾配を緩和させたところ、細胞ターンオーバーがほぼ完全に抑制された。すなわち、Minute 翅原基では Wg 依存的な細胞競合が細胞ターンオーバーの実体であることが分かった (図 2)。



では、なぜ Minute 翅原基では細胞ターンオーバーが引き起こされるのか。Wg の発現量を調べたところ、興味深いことに Minute 翅原基では野生型翅原基に比べ、Wg の発現量が高いことが分かった。そこで、この Minute 翅原基における Wg の発現上昇のメカニズムを遺伝学的に解析した。その結果、Minute 翅原基では、野生型翅原基に比べて核内受容体 Ecdysone Receptor (EcR) の発現が上昇していること、およびこの EcR の発現上昇が、進化的に保存されたがん抑制経路 Hippo 経路の不活化を引き起こし、それにより Wg の発現が上昇して通常よりも Wg の濃度勾配が強くなることが分かった。さらに興味深いことに、EcR の発現上昇が Minute 変異体の成長遅延を引き起こすことも分かった。具体的には、EcR の発現上昇がストレスシグナル経路である JNK シグナルを活性化し、これが分泌性のインスリン様ペプチド *dilp8* の発現を誘導して成長遅延を引き起こすことが、遺伝学的解析により明らかになった。

このようにして、Minute 翅原基では、Wg の発現量が野生型翅原基よりも高く、それが Wg 依存的な細胞競合を介した細胞ターンオーバーを引き起こすことと、その Wg 発現上昇のメカニズムの一端が明らかとなった。ここで疑問になるのが、Wg の発現上昇そのものが細胞ターンオーバーを引き起こし得る

のかということである。それを調べるために、野生型において *wg* のプロモーター制御下で Wg の発現を上昇させ、これにより Minute 翅原基と同様に D/V 軸上に存在する Wg 発現細胞の Wg の発現を上昇させたところ、細胞ターンオーバーは誘発されなかった。すなわち、Minute 翅原基で細胞ターンオーバーが誘発されるのは、Wg の発現上昇に加え、別の要因があると考えられた。では、何が関与しているのか。興味深いことに、「幼虫期の成長遅延」が Wg の発現上昇と協調して細胞ターンオーバーを引き起こすことが、遺伝学的解析により分かった。

以上の解析から、「成長遅延」および「Wg の発現上昇」という偶発的な刺激が幼虫期に引き起こされると、翅原基において細胞ターンオーバーが引き起こされ、それにより正常な翅形成を実現することが明らかとなった。本研究成果は、細胞間コミュニケーションを介してロバストな組織形成を実現するという新たなシステムの存在を示唆していると考えられる (Akai, #Ohsawa S (# equal contribution) *et al.*, 投稿中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) #Nakamura M, #Ohsawa S (# equal contribution), Igaki T: Mitochondrial defects trigger proliferation of neighboring cells via senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nature Commun.* 5: 5264, 2014 (査読有り) doi: 10.1038/ncomms6264.
- (2) #Takino K, #Ohsawa S (# equal contribution), Igaki T: Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 395: 19-28, 2014 (査読有り) doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.003.
- (3) Ohsawa S, Takemoto D, Igaki T: Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic cooperation” *J. Biochem.* 156: 129-136, 2014 (Review) (査読有り) doi: 10.1093/jb/mvu045.
- (4) Kunimasa K, Ohsawa S, Igaki T: Cell competition: the struggle for existence in multicellular communities. “New Principles in Developmental Processes” (Springer), 27-40, 2014 (Review) (査読なし)
- (5) Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T: JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity. *Dev. Biol.*, 403: 162-171, 2015

(査読有り) doi: 10.1016/j.ydbio.2015.05.001.

(6) Nishikawa S, Takamatsu A, Ohsawa S, Igaki T: Predator-prey interactions at the interface between two groups of cells in monolayer tissue. *J. Theor. Biol.*, 404; 40-50, 2016 (査読有り) doi: 10.1016/j.jtbi.2016.05.031

(7) #Yamamoto Y, #Ohsawa S (# equal contribution), Kunimasa K, Igaki T: The ligand Sas and its receptor PTP10D drive tumour-suppressive cell competition. *Nature*, 542: 246-250, 2017 (査読有り) doi: 10.1038/nature21033

[学会発表] (計 20 件)

(1) 大澤 志津江「上皮の恒常性維持を司る細胞競合の分子基盤」第 1006 回生物科学セミナー(東京大学)2015 年 1 月 7 日【招待講演】

(2) Ohsawa S, Kunimasa K, Yamamoto M, Igaki T: Cell competition that regulates epithelial homeostasis in *Drosophila*. **MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics** (National University of Singapore)、2014 年 12 月 4 日【招待講演】

(3) 大澤 志津江「細胞間コミュニケーションを介した上皮の恒常性維持」南紀生物セミナー(和歌山医科大学)、2014 年 9 月 6 日【招待講演】

(4) Ohsawa S, Kunimasa K, Igaki T: Dissecting the mechanism of cell competition that regulates epithelial homeostasis in *Drosophila*. 第 47 回日本発生生物学会大会(ウインク愛知)、2014 年 5 月 29 日、口頭発表

(5) 大澤 志津江、國政 啓、井垣 達吏「上皮細胞競合を駆動する細胞認識機構の遺伝学的解析」第 66 回日本細胞生物学会大会(奈良県新公会堂)、2014 年 6 月 12 日、口頭発表

(6) Akai N, Ohsawa S, Igaki T: Tissue growth regulation by "cell turnover" in *Drosophila*. **MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics** (National University of Singapore)、2014年12月4日、口頭発表

(7) 瀧野 恭子、大澤 志津江、井垣 達吏「エンドサイトーシス制御破綻が引き起こすアポトーシス誘導性増殖の分子基盤」第 23 回日本 Cell death 学会学術集会(東京医科歯科大学)、2014 年 7 月 18 日~19 日、ポスター発表

(8) 瀧野 恭子、大澤 志津江、井垣 達吏「エンドサイトーシス制御破綻が駆動する細胞非自律的な増殖制御機構」第66回日本細胞生物学会大会(奈良県新公会堂)、2014年6月11、口頭発表

(9) Takino K, Ohsawa S, Igaki T : Non-autonomous tissue growth by endocytic regulation of Eiger and Ras signaling. 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会(金沢歌劇座)、2014 年 6 月 4 日、口頭発表

(10) 中村 麻衣、大澤 志津江、井垣 達吏「細胞老化が駆動する非自律的な腫瘍悪性化の遺伝学的解析」第 37 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜)、2014 年 11 月 25 日、ポスター発表

(11) 中村 麻衣、大澤 志津江、井垣 達吏「細胞老化による細胞死耐性獲得と細胞非自律的な腫瘍悪性化」第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会(東京医科歯科大学)、2014 年 7 月 18 日、ポスター発表

(12) 中村 麻衣、大澤 志津江、井垣 達吏「細胞老化が駆動する非自律的な腫瘍悪性化の遺伝学的解析」第 66 回日本細胞生物学会大会(奈良県新公会堂)、2014 年 6 月 12 日、口頭発表

(13) Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T: Non-cell autonomous tumor progression driven by cellular senescence. 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会(金沢歌劇座)、2014 年 6 月 6 日、ポスター発表

(14) 和田 弥生、大澤 志津江、井垣 達吏「Hippo 経路を介した発生ロバストネス制御機構の遺伝学的解析」第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会 合同大会(神戸ポートアイランド) 2015 年 12 月 1 日、口頭発表

(15) 大澤 志津江、赤井 菜々美、井垣 達吏「発生ロバストネスを支える細胞競合の分子機構」第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会 合同大会(神戸ポートアイランド)、2015 年 12 月 2 日、ワークショップ「細胞競合」【招待講演】

(16) 乾 由希子、大澤 志津江、井垣 達吏「ロバストな発生現象を支える細胞ターンオーバーの遺伝学的解析」、第 88 回日本生化学会 合同大会(神戸ポートアイランド)、2015 年 12 月 3 日、ポスター発表

(17) Ohsawa S, Akai N, Igaki T: Ensuring robust control of organ size by "cell-turnover" in *Drosophila*. **the CDB Symposium 2016 -Size in Development: Growth, Shape and Allometry-**

(理研 CDB)、2016 年 3 月 28 日～3 月 30 日、ポスター発表

(18) 乾 由希子、大澤 志津江、井垣 達吏「ロバストな形態形成を支える細胞ターンオーバーの遺伝学的解析」第 68 回日本細胞生物学会・第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会 合同大会 (京都テルサ)、2016 年 6 月 15～17 日、ポスター発表

(19) Ohsawa S: Epithelial cell-turnover ensures morphogenetic robustness in *Drosophila*. **Japan-Austria joint meeting “Understanding the logic behind developmental dynamics”** (IST, Austria), 2016 年 11 月 29 日【招待講演】

(20) Ohsawa S, Akai N, Igaki T: Epithelial cell-turnover ensures morphogenetic robustness in *Drosophila*. **Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologist** (Kiel, Germany), 2017 年 3 月 17 日【招待講演】

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 志津江 (Ohsawa Shizue)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授
研究者番号：80515065

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者

井垣 達吏 (Igaki Tatsushi)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：00467648

赤井 菜々美 (Akai Nanami)

神戸大学・大学院医学研究科・大学院生

和田 弥生 (Wada Yayoi)

京都大学・大学院生命科学研究科・大学院生

乾 由希子 (Inui Yukiko)

京都大学・大学院生命科学研究科・大学院生